

PCT/JP 99/04834

07.09.99

Ekv

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4834

REC'D 22 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 9月 7日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第252128号

出願人

Applicant(s):

理化学研究所
間 陽子

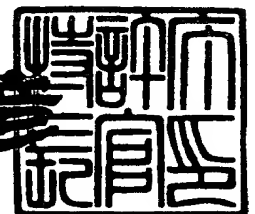
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3067639

【書類名】 特許願

【整理番号】 98199M

【提出日】 平成10年 9月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 ウシ白血病発症可能性の判定用抗体

【請求項の数】 6

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつく
 ば3-105

 【氏名】 間 陽子

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつく
 ば3-105

 【氏名又は名称】 間 陽子

【代理人】

 【識別番号】 100092635

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096219

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

 【識別番号】 100095843

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ウシ白血病発症可能性の判定用抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143。

【請求項 2】 ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC Class II DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143。

【請求項 3】 ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC Class II DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 4】 ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC Class II DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ MHC Class II DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウシ白血病ウイルス BLV に対するウシの白血病の発症可能性を判定するために用いるモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

主要組織適合抗原 (MHC) は、生体の感染防御機構において自己-非自己の識別に関与する分子であり、 α 鎖及び β 2M からなるクラス I と α 鎖及び β 鎖からなるク

ラスIIとからなり、それぞれの $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ドメイン及び $\alpha 1$ と $\beta 1$ ドメインには抗原ペプチドを噛み込む溝が存在している。そして、この溝に収容された断片化ペプチドのみがT細胞レセプターによって認識されるという特徴を有しており、クラスIを認識したCD8+細胞によって細胞死（細胞性免疫）が達成され、クラスIIを認識したCD4+細胞によって主として抗体産生（液性免疫）が誘導される。

【0003】

MHCは最も多型に富んだ遺伝子群であり、そのハプロタイプによってペプチド収容溝のポケットの位置、形、大きさ、及び性状が異なり、それに伴って噛み込まれる断片化ペプチドの結合状態が変化し、個体ごとの免疫応答及び疾患感受性を決定しているものと考えられている。MHCハプロタイプと疾患抵抗性（抗病性）又は発症可能性（易病性）との相関については、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、成人T細胞白血病ウイルス（HTLV）、及びマラリヤに関する報告がある。

【0004】

ウシMHC(BoLA)クラスII遺伝子については、これまでにDQA, DQB, DRA, DRB, DNA, DOB, DYA, 及びDYB遺伝子の存在が推測されている。なかでも、DRB遺伝子座において同定されている3つの遺伝子(DRB1 ~B3)のうち、DRB3については機能的な蛋白質をコードすることが知られており、現在までに73種類の対立遺伝子の存在が明らかにされている。しかしながら、ウシの感染性疾患とウシMHC(BoLA)ハプロタイプとの相関については従来ほとんど報告がない。

【0005】

特に、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）と同様にウイルス増殖を調節する遺伝子pXを有しており、HTLV-Iに最も近縁のレトロウイルスであるウシ白血病ウイルス(BLV)については、ウシMHC(BoLA)ハプロタイプとの相関に関して米国のグループが抗病性を中心に報告しているが、白血病発症可能性との関連性の報告は全くない。このウイルスに感染したウシの割合（日本における感染率）は10~20%であり、そのうちの1~2%は10~15年程度という長期の潜伏期間の後に極めて悪性の地方病性ウシ白血病を発症して死に至るので、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻である。ウシMHC(BoLA)ハプロタイプの解析によってBLV感染後のウシの発症可能性を簡単に判定できるようになれば、発症抵抗

性のウシを予め選択して飼育することが可能になり、極めて安全にウシの飼育を継続することが可能になるものと期待される。

【0006】

本発明者は、先に、ウシMHC(BoLA) クラスII遺伝子のうち、DRB 遺伝子座の構造を解析して、DRB3遺伝子(BoLA-DRB3) 及びその遺伝子産物の構造を明らかにした (Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995)。本発明者はさらにこの遺伝子の機能を研究するうち、白血病発症牛と未発症牛とでは、BoLA-DRB3 の中で特に多型が認められる第二エクソンからの遺伝子産物 (β 1ドメイン) において、明らかにアミノ酸配列の異なる部分が存在することを見いだした。また、このアミノ酸置換が、BLV に対する発症可能性及び発症抵抗性に直接関与していることを見いだした。そして、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定するにあたり、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyrであるウシ個体は白血病の発症可能性ありと判定することができることを見出し、該方法に係る発明を完成させた (国際公開W098/3680)。

【0007】

一方、ウシ白血病の病態の悪化に伴ってBLV感染細胞に過剰発現してくる腫瘍関連抗原に対して反応するモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体c143) が知られている ((a)Aida, Y. et al., Cancer Research, 52, pp.6463-6470, 1992; (b)Aida, Y. et al., Cancer Research, 53, pp.429-437, 1993)。上記刊行物(a)(p.6469, 左欄)及び(b)(p.436, 左欄)には、上記モノクローナル抗体が認識する腫瘍関連抗原が MHC ClassII抗原に関係していることが示唆されているが、このモノクローナル抗体とMHC ClassII抗原との反応に関しては詳細には解明されておらず、また、上記モノクローナル抗体のエピトープの構造に関しては従来全く知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記判定方法 (W098/3680) に行うにあたっては、ウシ個体の生体試料を採取して目的の遺伝子を増幅し、BoLA-DRB3のエクソン2 遺伝子の塩基配列を決定する

か、PCR-RFLP法を行う必要がある。上記刊行物には、この判定方法に有用なプライマー・セットも開示されているが、多数のウシ個体について上記の判定方法を実施することは煩雑であり、時間もかかるため、さらに簡便な判定方法の開発が求められている。

【0009】

従って、本発明の課題は、ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV) に対する白血病発症の可能性を簡便かつ正確に判定する手段を提供することにある。より具体的には、BoLA-DRB3のエクソン2の塩基配列を決定する必要がなく、正確にウシ個体のウシ白血病ウイルスに対する白血病発症の可能性を判定する手段を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、BLV感染細胞に過剰発現してくる腫瘍関連抗原に対して反応するモノクローナル抗体（モノクローナル抗体c143）が、ウシ白血病に対して発症可能性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出でき、極めて高精度に白血病発症の可能性を判定できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0011】

すなわち本発明は、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体c143；ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体c143；並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体c143を提供するものである。

【0012】

また、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR分子に対してモノクロ

ーナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体；ウシ白血病に対して発症可能性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR分子に対してモノクローナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体；並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR分子に対してモノクローナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体が提供される。

【0013】

別の観点からは、本発明により、上記モノクローナル抗体（好ましくはモノクローナル抗体c143）を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬が提供される。また、モノクローナル抗体c143を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出する方法；モノクローナル抗体c143を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出する方法；並びに、モノクローナル抗体c143を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出する方法が提供される。

【0014】

さらに別の観点からは、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出することができるモノクローナル抗体；ウシ白血病に対して発症可能性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出することができるモノクローナル抗体；並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出することができるモノクローナル抗体が提供される。このモノクローナル抗体の好ましい例はモノクローナル抗体c143である。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明の方法の対象となるウシは特に限定されず、ウシ白血病ウイルスBLV に感染する可能性があり、感染により白血病を発症する可能性があるものであれば、乳用種、乳肉兼用種、肉用種、役用種、及び役肉兼用種などのいかなるウシを対象としてもよい。具体的には、例えば、黒毛和種、日本短角などの和牛、ホルスタイン、ジャージー、ヘレフォード、アバディーンアンガス、フリーシャン等の品種を挙げることができるが、これらの品種に限定されることはない。

【0016】

本発明のモノクローナル抗体としては、好ましくはモノクローナル抗体c143を用いることができるが、モノクローナル抗体c143のほか、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR分子に対してモノクローナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体を用いてもよい。本明細書において用いられる「MHC ClassII DR分子」という用語は、MHC ClassII DR α 鎖の一部又は全部とMHC ClassII DR β 鎖の一部又は全部とを含む分子を意味する。

【0017】

モノクローナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体は、本明細書の実施例に具体的に説明された方法に準じて診断を行った場合に、モノクローナル抗体c143と同様な判定結果を与えるか否かを判断基準として当業者に容易に選択可能である。このようなモノクローナル抗体としては、マウス、ラット、ウサギなど、適宜の哺乳類動物由来のものを使用することが可能である。なお、モノクローナル抗体c143（マウス、IgG2b）は文献記載の方法に従って当業者に容易に製造可能である（Aida, Y. et al., Cancer Res., 45, pp.1174-1180, 1985）。

【0018】

ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列については、一方又は両方の対立遺伝子のアミノ酸配列（アミノ酸番号75-78）がVal-Asp-Thr-Tyr である場合には、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染している場合、又はウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合には、その個体は白血病発症の危険性が高いことが知られている（国際公開W098/3680；この公報の開示を本明細書の開示として含める）。一方、

対立遺伝子におけるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Thr-Val (VDTV) とのヘテロ ; Val-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Arg-Val (VDRV) とのヘテロ ; Val-Asp-Thr-Val (VDTV)ホモ ; Val-Asp-Arg-Val (VDRV)ホモ ; 又は、Val-Asp-Arg-Val (VDRV)とVal-Asp-Thr-Val (VDTV)ヘテロである場合などは、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染しているか、ウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合であっても、白血病を発症する可能性は非常に低い。

【0019】

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明のモノクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体c143は、ウシMHC ClassII DR分子に結合するが、その β 鎖のアミノ酸配列中にVal-Asp-Thr-Tyr (アミノ酸番号75-78) を有する場合に高い反応性を有している。従って、本発明のモノクローナル抗体が高い反応性を示すウシ個体は、MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインにおいてVal-Asp-Thr-Tyr (アミノ酸番号75-78) をコードする遺伝子(ウシ白血病に対して発症可能性を示す遺伝子)を有しており、ウシ白血病を発症する可能性が高い。なお、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸配列については、間ら (Aida, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995)による報告がある。

【0020】

上記のモノクローナル抗体を用いて、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出する方法は特に限定されず、モノクローナル抗体と抗原との結合を検出できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、蛍光抗体法やフローサイトメトリー法、ELISA法、免疫組織学的検索法など、当業者に利用可能な検出法はいずれも適用可能である。検出を容易にするため、モノクローナル抗体として、蛍光物質、放射性同位元素、アビジン(又はビオチン)などで標識されたモノクローナル抗体を用いることができる。このような標識方法は当業者に周知されており、適宜の手段を採用することが可能である。

【0021】

本発明の好ましい態様では、試料としてウシ個体から分離・採取したリンパ球を

用いて、ウシMHC ClassII DR分子とモノクローナル抗体との反応性を調べることができる。例えば、ウシ個体から末梢血を抗凝固剤入りの注射筒で採取し、4℃、3,000rpmの条件下で20分間遠心して白血球層を得た後、宮坂らの方法 (Miyasaka, m. and Trnka, Z., Immunological Methods, Vol.3, pp.403-423, 1985, Academic Press, NY) により白血球から末梢血リンパ球を調製することも可能である。

【0022】

末梢血リンパ球に対して本発明のモノクローナル抗体が高い反応性を示した場合には、このウシ個体は、ウシ白血病に対して発症可能性があると判定される。試料として、リンパ節や腫瘍組織などの切片を用いてもよい。通常は、対照群を用意するか、標準試料などを用いてモノクローナル抗体の反応性の程度を調べることができる。なお、PCR 法によってウシMHC ClassIIDR分子をコードする遺伝子を増幅し、その遺伝子産物に対して上記モノクローナル抗体の反応性を検討することも可能である。

【0023】

本発明の診断薬は、上記のモノクローナル抗体を有効成分として含み、ウシ個体についてウシ白血病の発症可能性があるか否かを判定するために用いられる。一般に、モノクローナル抗体を含む診断薬は種々の形態で調製できることが知られており、本発明の診断薬も適宜の形態の製剤として調製可能である。例えば、凍結乾燥形態の製剤、又は溶液状の形態の製剤などとして提供することができる。本発明の診断薬は、その形態に応じて、適宜の製剤用添加物の1種又は2種以上を用いて調製することが可能である。製剤用添加物としては、例えば、pH調節剤、溶解補助剤、防腐剤、緩衝剤、賦形剤などを用いることができるが、これらに限定されることはない。

【0024】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

1. 材料と方法

BLVによる白血病発症に対して抵抗性あるいは感受性を示すウシMHCクラスIIDR β 鎖をコードする遺伝子を保有するウシ個体から、末梢血リンパ球を分画しmRNAを抽出した。mRNAを鋳型として、オリゴ(DT)プライマーを用いて逆転写酵素によりcDNAを合成した。さらに、得られたcDNAを鋳型として、以下の二つのプライマー:

5'-TGGCTCGAGCCTCTGCTGTTCTCCGGCAT-3' 及び

5'-TGGTCTAGAACTTCAGCTCAGGAGCCCTG-3'

を用いたPCR法により、DR β 鎖の全てのコード領域を含むcDNAクローンを単離した。用いたプライマーにはXhoIとXbaIサイトが付加してある。得られたPCR産物(cDNAクローン)を塩基配列決定用ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を決定して目的の遺伝子であることを確認した。

【0025】

BLVによる白血病に対して抵抗性を示すMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子(以下、「BoLA-DRB3」と呼ぶ。)の対立遺伝子として、*0902, *0701, *1101, *1401のcDNAを、一方、感受性を示すBoLA-DRB3対立遺伝子として、*1501, *1601, *1302, *1001のcDNAを単離した。各cDNAをXhoIとXbaIサイトで発現ベクターpME18Neoに挿入し、以前に単離した α 鎖の全てのコード領域を含むcDNAクローン(Aida, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 204, pp.195-202, 1994)を挿入した発現ベクターと、COS1細胞あるいは23CLN細胞に一過性に共導入した。導入から約40時間後に、モノクローナル抗体c143を用いて、間接蛍光抗体法とフローサイトメトリー法を行ない、その反応性について解析した。

【0026】

2. 結果

モノクローナル抗体c143は、BLVによる白血病発症に対して感受性を示すBoLA-DRB3遺伝子のcDNAを導入したDR抗原発現細胞と強く反応した。なかでも、最も白血病発症牛に高頻度に認められる対立遺伝子である*1601 cDNAを導入した発現細胞に極めて強い反応性を示した。結果を下記の表に示す(*モノクローナル抗体c143との反応性により、+: 弱; ++: 中; +++: 強に分類した; ** DR β 鎖の78位

のアミノ酸残基が V をコードする対立遺伝子を白血病発症に対して抵抗性、Y をコードする対立遺伝子を危険性と判定した；*** BoLA-DRB3*1601 cDNA クローンは既に単離され、NR1 と命名されている (Aida, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995)。

【0027】

【表1】

α鎖の cDNA / β鎖の cDNA	DR β鎖の 78 位のアミノ酸残基が V or Y**	c143 抗体との反応性*
MR1 / BoLA-DRB3*0902	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*0701	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1101	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1401	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1501	Y	++
MR1 / BoLA-DRB3*1601 (NR1)***	Y	+++
MR1 / BoLA-DRB3*1302	Y	++
MR1 / BoLA-DRB3*1001	Y	++

【0028】

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体を用いると、ウシ個体のウシ白血病ウイルス (BLV) に対する白血病発症の可能性を簡便かつ正確に判定することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を簡便かつ正確に検出する手段を提供する。

【解決手段】 ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体c143；ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシMHC ClassII DR分子に対してモノクローナル抗体c143と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体；並びに、上記モノクローナル抗体を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000006792
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】
【識別番号】 598122278
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 4 丁目 2 1 番 2 号 シャレール
つくば 3-105
【氏名又は名称】 間 陽子

【代理人】 申請人
【識別番号】 100092635
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100096219
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】
【識別番号】 100095843
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 釜田 淳爾

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598122278]

1. 変更年月日 1998年 9月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつくば3-
105

氏 名 間 陽子

THIS PAGE BLANK (USPTO)